

のプルランの製造が可能になつた。

本発明に用いる菌株はプルラン生産能を有する菌株であれば何れの菌株でも良く、又その類似する変異菌株でも良い。例えば *Pullularia fermentans* var. *fermentans* IFO 6401, *Pullularia fermentans* var. *fusca* IFO 6402, *Pullularia pullulans* AHU 9553, *Pullularia pullulans* IFO 6353 又は *Dematioides pullulans* IFO 4464 等多くの菌株が用いられる。¹⁰

培養培地としては前記文献にある様な炭素源シユークロース、転化糖、異性化糖、果糖、グリコース等が用いられるが、特に本発明者等の先願になる。特願 46-79413「プルランの製造法」に示した様な澱粉部分加水分解物を用いた時に効果が大きい。¹⁵ 炭素源としては通常用いられるアンモニウム塩、硝酸塩又は有機窒素としてペプトン等が用いられる。他に磷酸塩、マグネシウム、鉄等の金属イオンの適量を加え液体培地を調整し、加熱滅菌した後 PH を調整して菌株を植菌し、通気培養又は振とう培養を行うことは常法通りである。培養温度は 25~30°C で 27°C 位が好ましい。培養時間は大体 7 日以内であり、3 日位で相当量のプルランの生成が見られ、粘度増加が起る。残糖を経時的に測定して最低になつた時に培養を中止し、常法通り菌体を遠心分離により除去し、色素の生成の甚だしい時は活性炭の添加により脱色し、出来得れば濃縮してメチルアルコール、エチルアルコール等親水性の有機溶媒を加えてプルランを沈澱させて遠心分離し、必要ならば温水に溶解し、アルコール類の添加による沈澱精製を繰返す。製品は乾燥後収率を測定する。プルランは白色、水可溶性の粉末として得られる。

以上の培養により得られるプルランの重合度、収量は培養条件により大巾に変化する。即ち分子量は 5 万~450 万、対糖収率は 20~75% の変化が見られる。

前述の様に一般的なプルランの製法を挙げたが、本発明の PH、磷酸の影響に就いて説明すれば、実施例に示す如く澱粉部分加水分解物の 10% を 40 炭素源とし、ペプトンを窒素源として他に K_2HPO_4 , $NaCl$, $FeSO_4$, $(NH_4)SO_4$ を少量含有する培地で培養した場合、培地の始発 PH を 5~7.5 の範囲に変化させた時の培養の経過を

数種の菌株に就いて見ると、PH 6.5 以下に於ては粘度(培養液)は増加して 300 c.p. 以上となり明らかに粘性を示し、PH 7.0 以上では粘度は低く 240 c.p. 以下で殆んど粘性が見られない。この際前記方法で分離精製したプルランは PH 5~6 では重合度(分子量) 10~400 万と増加し、培養液自身も非常に粘性を増加して培養液が流動不可能になる。一方 PH 6.0 以上の場合はその粘度は殆んど感じない程度で低く、生産も少なそうに思われるが収率としては 50~75% が得られた。その分子量はセファデツクス済過で分離した結果 5~10 万位の低分子であることが知られる。

古い文献に於ては収率 20~50% であることとくらべ収率の明らかな増加が認められた。

PH の種々異なる培地で 4 日、6 日、7 日の培養経過を見ると、低 PH (5.5) に於ては粘度は 1000 c.p. 以上を示すのに對し、PH 7.0~8.0 に於ては粘度 24~31 c.p. を示すに過ぎない。しかし収率を比較すると高 PH である PH 7.0~8.0 に於ては 50% 以上の高収率を示した。即ち PH 5.5 で対糖収率 30% のものが PH 6.5~7.0 に於ては対糖収率 50% 以上を示した。この場合の平均分子量は PH 6.0 で約 300 万であるが、PH 7.0 に於ては約 8 万であつた。このように収率が変化すると共に平均分子量も大巾に変化させることが可能である。

又この場合の残糖の変化、対糖収率を 4 日、6 日、8 日に就いて見ると残糖は最終まで徐々に減少し、収率は増加する。尚 8 日目の残糖は、3 g/100 ml 以上である。しかし PH 7.0~7.5 に於ては残糖は 3~4 日で大部分 減少し 0.1~1.0 g/100 ml であり、プルラン収率はこれに並行して 4~6 日で殆んど最高値に達する。即ち PH の高い方が糖消費とプルランの生成が早く又収率も高いことを示している。

前述した様な PH の調整によるプルラン収率の増加、培養時間の短縮効果は、データ抽出液を炭素源として使用した時に特に顕著に現われる。

データ抽出液はデータの約 50% の糖質を含有し、その組成はグルコース、フラクトースを大体等量含有し、他は無機塩類を含有し、Total anion は 2500~3500 mg as $CaCO_3$ /l である。本液を活性炭脱色又はそのまま培地の

炭素源として用いる時は、培養時間は同様に短縮され収率も増加する。しかしデーツ抽出液をイオン交換精製して純糖液として用いる時は、澱粉部分分解物又は蔗糖を炭素源とした場合と同様で、特別の変化は見られない。このことはおそらく多量に含まれるイオンの緩衝作用により、培養末期までPHの低下が起こらないことに原因すると考えられ、工業的実施に当たりデーツ抽出液を炭素源として使用することは優れた特徴があるものと考えられる。

更に培養培地の磷酸濃度が培養時間と収率に影響する。例えば K_2HPO_4 を0.1～0.5%の濃度で使用し、PH 5.5～6.5で試験した結果は、PH 5.5にては前記の通り高分子量のプルランが得られ、150～450万の分子量を示すが、15 PH 6.5にては分子量は減少し、0.1～0.3%の磷酸濃度では200～300万の分子量のプルランが得られ、PH 6.5にても同様に磷酸濃度0.5%ではプルラン分子量は7万であるが0.1～0.2%では約20万の分子量を示す。以上の様にて始発PHの低い時は一般に分子量は大であるが、磷酸濃度により変動する。か様に始発PH及び磷酸濃度の変化に伴い生成プルランの分子量を制御

することができる。

実施例 1

PH変化による生成プルラン分子量の変化

a) 使用菌株は *Dematiu m pullulans*

5 IFO 4464, 及び *Pullulalia pu-*
llulans-2 (Kp-13 と呼ぶ) である。培養培地は水飴 (DE 43) 10%, K_2HPO_4 0.2%, $NaCl$ 0.2%, ベプトン 0.2%,
10 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, よりなる培地を用い、種培養は上記培地に各菌株を27℃で2日間培養したもの

を2～3%用いた。

15 本培養は上記培地 100 ml を 500 ml 三角フラスコに採り、滅菌後 PH を 5.5～7.5 にて調整し、各菌株の種培養液を 2% 添加して回転振とう機で 27℃ で 7 日間培養した。

培養終了後菌体を遠心分離し、上澄液に粉末活性炭を加えて脱色済過し、メチルアルコールを加えて 50% 濃度にし、沈澱を遠心分離し、少量の水に再溶解し、メタノール沈澱を繰返して精製後メタノールで洗浄して真空乾燥した。

実験結果は下表の通りである。

第 1 表

Dematiu pullulans IFO 4464

始 発 P H	最 終 P H			※ 濁 度 (× 10)	残 糖 (g/100ml)	プルラシ吸率 %	平均分子量		
	4 日	6 日	7 日						
5.5	3.30	3.30	3.22	0.9	1.4	1.8	5.05	2.44	1.65
	3.30	3.38	3.32	0.9	1.3	1.6	5.19	2.39	1.73
6.0	3.5	3.5	0.9	1.4	1.9	3.8	2.5	2.0	2.6
	3.4	3.5	3.4	1.0	1.5	1.8	4.1	2.8	2.2
6.5	3.7	3.6	3.6	1.1	1.5	1.7	2.8	1.7	1.7
	3.7	3.6	3.7	1.0	1.7	1.7	2.9	1.9	1.8
7.0	3.9	3.9	3.8	1.1	1.8	2.0	1.9	1.5	1.0
	3.9	3.9	3.8	1.1	1.7	1.9	2.0	1.3	1.2
7.5	4.2	4.2	4.2	1.1	1.9	2<	1.8	1.0	0.5
	4.2	4.2	4.3	1.2	1.8	2<	1.9	1.1	1.0
8.0	4.7	4.5	4.6	1.2	1.8	2<	1.5	0.1	0.08
	4.7	4.5	4.7	1.1	1.7	2<	1.6	0.03	0.05

(4)

昭51-42199

K P - 1 3

始発 P H	最 終 P H	※濁度 ($\times 10$)	残 糖 (g/100ml)	アルラン収率%	平均分子量
	4日 6日 8日	4日 6日 8日	4日 6日 8日	4日 6日 8日	
5.5	3.3 3.3 3.2	0.9 1.3 1.8	5.0 1.9 1.2	17 27 38	246×10^4
6.0	3.4 3.4 3.3	1.1 1.5 1.8	2.8 1.7 1.0	31 40 55	292 "
6.5	3.6 3.6 3.5	1.2 2< 2<	1.6 1.0 0.1	35 68 70	20 "
7.0	4.0 3.9 3.9	1.3 2< 2<	1.5 0.5 0.05	31 69 75	8 "

※濁度($\times 10$)は10倍稀釀液の濁度を示す。

以上の結果はKP-13と *Dematiu m pu-15** PH 6.5以上に於て培養時間も半減し、又収率も *lulans*に就ての結果は必ずしも一致しないが、向上することが確認される。
PHに就いては7.0以上では分子量は非常に小となり、6.0以下では非常に大になりその変化の傾向は一致する。分子量の絶対値は各菌株により多少の差は現われる。又収率と培養時間の傾向は *20

b) 実施例1-a) IC準じKP-13菌株を用いて培養培地として炭素源にシュークロースを用いて培養した結果は次の表の通りである。

第 2 表

K ₂ HPO ₄ 添加 %	始発 P H	対糖収率%		平均分子量
		4日	7日	
0.1	5.5	21	27	250×10^4
0.2		35	40	250 "
0.3		35	42	280 "
0.4		36	43	260 "
0.5		37	46	150 "
0.1	6.0	20	25	280×10^4
0.2		37	50	300 "
0.3		37	55	200 "
0.4		40	61	80 "
0.5		41	67	30 "
0.1	6.5	20	26	20×10^4
0.2		31	39	15 "
0.3		57	65	8 "
0.4		68	70	7 "
0.5		70	72	7 "

c) 実施例1-a) に準じ、*Pullularia**pullulans* IFO 6353 菌株を用い、グ* 通りである。

*グルコースを炭素源として培養した結果は次の表の

第 3 表

K ₂ HPO ₄ 添加 %	始発 PH	対糖収率 %		平均分子量
		4日	7日	
0.1	5.5	18	25	270 × 10 ⁴
0.2		21	32	270 "
0.3		31	38	280 "
0.4		34	40	200 "
0.5		35	40	110 "
0.1		20	28	180 × 10 ⁴
0.2	6.0	38	49	200 "
0.3		41	57	200 "
0.4		43	63	50 "
0.5		45	65	20 "
0.1		25	28	25 × 10 ⁴
0.2	6.5	34	37	15 "
0.3		61	68	8 "
0.4		65	68	5 "
0.5		67	70	5 "

以上の通りグルコース培地に於ける培養に於ても磷酸イオン濃度、始発PHのブルラン収率及びブルラン分子量に及ぼす影響は同一傾向を取ることがうかがわれる。

実施例 2

PH と K₂HPO₄ 濃度変化に伴うブルラン分子

質量の変化

使用菌株及び培養条件は実施例1-a) に等しい。PH変化は5.5～6.5, K₂HPO₄ %は0.1～0.5%に変化した場合の平均分子量の変化を次表に示す。培養日数は7日である。

使 用 菌 株 KP-13

K ₂ HPO ₄ 添加 %	始発 PH	対糖収率 %	平均分子量
0.1	5.5	25	200 × 10 ⁴
0.2		38	250 "
0.3		38	300 "
0.4		40	260 "
0.5		47	150 "
0.1		23	200 × 10 ⁴

0.2		5.5	300 × 10 ⁴
0.3	6.0	5.9	150 "
0.4		6.5	70 "
0.5		7.0	20 "
0.1		2.5	20 × 10 ⁴
0.2		4.0	20 "
0.3	6.5	7.0	6.5 "
0.4		7.2	7.0 "
0.5		7.3	7.0 "

使用菌株 IFO 4464

培地 PH 6.5

K ₂ HPO ₄ 添加 %	対糖収率 %	平均分子量
0.1	4.0	200 × 10 ⁴
0.2	6.0	200 "
0.3	7.0	290 "
0.4	7.0	350 "
0.5	7.1	62 "

以上の結果より見る時 0.2 ~ 2.4 % の K₂HPO₄ 25 2500 ~ 3500 mg である。本液を更にイオンの添加が高分子ブルランを得るには好ましい。

実施例 3

本実施例は菌株培養の炭素源としてデーツの抽出液を用い他の条件は実施例 1 にならつた。デーツは食用及び工業デーツを 3 ~ 4 倍の温水に浸漬し、時々攪拌し 3 時間後沪過上澄液を集めて粉末炭にて脱色して精製した。濃度 1.8 % (還元糖として) その 50 % はグルコース、残りは果糖と少量のペントース等を含有する。(着色度は大で) トータルアニオンは CaCO₃ として 1 ℥ 当り

交換精製した液を製し、両糖液を炭素源とした。対糖灰分として 2 % 前後あり、活性炭脱色液を炭素源として実施例 1 同様 1.0 % 用いた。

デーツ抽出液 1.0 % (固型分として)、K₂HPO₄ 30 0.3 %、ペプトン 0.2 %, NaCl 0.2 %, MgSO₄ · 7H₂O 0.04 %, FeSO₄ · 7H₂O 0.001 %、を含む培地を滅菌し、これを PH 6.5 に調整し、種菌は 41 時間培養液を 2 % 添加し、144 時間振とう培養した。後処理は実施例 1 の通りブルランを分離し収率、分子量を測定した。

15

16

糖(デ ーツ) 種類	終　　末　PH				濁　度　(x 10)				残　糖(g/100ml)				対　糖　收　率　%			
	48 hr	96 hr	120 hr	144 hr	48 hr	96 hr	120 hr	144 hr	48 hr	96 hr	120 hr	144 hr	48 hr	96 hr	120 hr	144 hr
デーツ	4.6 4.6 5.5.1				0.95 1.25 1.22				4.7 0.4 0.5				22.9 68 67			
脱色液	4.7 5.0 5.6				0.96 1.23 1.25				4.3 0.2 0.3				30.6 73 76			
デーツ イオン交換 精製	3.8	3.8	3.8	3.9	0.7	0.9	1.0	1.0	5.5	2.4	1.0	0.2	19	45	51	58
	3.8	3.7	3.7	3.7	0.6	0.8	0.9	1.0	6.2	3.1	2.1	1.1	23	46	59	60

以上の結果の明示する通りデーツ抽出液は培地炭素源として良い結果が得られるが、イオン交換精製と非精製との間に培養経過及びプルラン生成 15

時期に明らかな差が見られ、イオン精製しない液の方が培養時間は少なく好収率が得られた。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.